



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07H 1/08, C12Q 1/68, G01N 27/447	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/34909 (43) Date de publication internationale: 25 septembre 1997 (25.09.97)
--	----	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00496

(22) Date de dépôt international: 20 mars 1997 (20.03.97)

(30) Données relatives à la priorité:

96/03753	20 mars 1996 (20.03.96)	FR
96/04691	9 avril 1996 (09.04.96)	FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy-l'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CROS, Philippe [FR/FR]; 90, rue du Commandant-Charcot, F-69005 Lyon (FR). ELAISSARI, Abdelhamid [FR/FR]; 8, rue Jacques-Monod, F-69007 Lyon (FR). MABILAT, Claude [FR/FR]; 408, chemin Pierre-Drevet, F-69140 Rillieux-la-Pape (FR). PICHOT, Christian [FR/FR]; 5, allée Roland-Garros, F-69960 Corbas (FR). RODRIGUE, Marc [FR/FR]; 14E, chemin de Gargantua, F-69570 Dardilly (FR). SANTORO, Lise [FR/FR]; 1, place des Quatre-Vierges, F-69110 Sainte-Foy-Les-Lyons (FR).

(74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cédex 06 (FR).

(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: NUCLEIC ACID ISOLATION

(54) Titre: ISOLEMENT DE L'ACIDE NUCLEIQUE

(57) Abstract

A method for aqueous phase nucleic acid isolation from a sample, comprising a step of nucleic acid adsorption on a particulate substrate, is disclosed. The method comprises an adsorption reagent preparation step (a) providing an adsorption reagent that includes a sol consisting of an aqueous continuous phase and a dispersed particulate substrate phase including a functionalised particulate polymer prepared by polymerising (1) a first water-soluble acrylamide or acrylamide derivative monomer, (2) at least one cross-linking agent and (3) at least one second water-soluble, cationic and functional monomer, said polymer having a predetermined lower critical solubility temperature (LCST) of 25-45 °C; a contact step (b) wherein the adsorption reagent is contacted with the sample containing the nucleic acid; an adsorption step (c) wherein, to carry out the contact step (b), at least one parameter is selected for the reaction medium, said parameters being a pH no higher than 7, an ionic strength no higher than 10⁻² M, and a temperature lower than the polymer LCST; a separation step (d) wherein the dispersed phase is separated from the continuous phase, optionally after it has been observed that adsorption has occurred; and a desorption step (e) wherein the nucleic acid is desorbed from the particulate substrate by increasing the ionic strength until an ionic strength higher than 10⁻² M is achieved.

(57) Abrégé

Procédé d'isolement, en phase aqueuse, d'un matériel nucléique, présent dans un échantillon, comprenant une étape d'adsorption dudit matériel nucléique, sur un support particulaire, caractérisé en ce que: selon une étape (a) dite d'obtention du réactif d'adsorption, on dispose d'un réactif d'adsorption comprenant un sol constitué par une phase continue aqueuse et une phase discontinue du support particulaire qui comprend un polymère particulaire, fonctionnalisé, ledit polymère étant obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3) au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et hydrosoluble, et ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui est comprise entre 25 et 45 °C; selon une étape (b) dite de mise en contact, on met en contact le réactif d'adsorption avec l'échantillon contenant le matériel nucléique; selon une étape (c) dite d'adsorption, pour la mise en contact selon (b), on choisit au moins un des paramètres suivants pour le milieu réactionnel: pH au plus égal à 7; force ionique au plus égale à 10⁻²M; température inférieure à la LCST du polymère; selon une étape (d) dite de séparation, après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, on sépare la phase discontinue de la phase continue; et selon une étape (e) dite de désorption, on dissocie, par désorption, le matériel nucléique par rapport au support particulaire, en augmentant la force ionique jusqu'à une force ionique supérieure à 10⁻²M.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

ISOLEMENT DE L'ACIDE NUCLEIQUE

La présente invention appartient au domaine de la purification des acides nucléiques, en milieu aqueux.

5 On connaît selon le document WO-A-95/04140 un procédé pour purifier, en milieu aqueux, des acides nucléiques présents dans un échantillon, selon lequel on met en contact ledit échantillon avec un système
10 particulaire consistant en des billes de silice, en présence d'une substance chaotropique, puis on sépare de la solution aqueuse finale les acides nucléiques fixés sur les billes.

Conformément au document F. MEUNIER et al., Polymers for Advanced Technologies, Vol 6, pp 489-496,
15 (1995), on décrit la préparation d'un polymère dénommé PNIPAM, par polymérisation de (1) N-isopropylacrylamide, (2) N,N-méthylène bisacrylamide et (3) chlorure de 2-aminoéthyl-méthacrylate, en présence d'un amorceur de polymérisation. Le comportement de ce polymère
20 fonctionnalisé en surface peut le rendre particulièrement adapté à une fixation par covalence, de molécules biologiques.

Le document EP-A-0 161 881 enseigne qu'un polymère thermosensible tel que les polymères obtenus par
25 copolymérisation de monomères de N-alkyl- ou de N-alkylène-acrylamide ou méthacrylamide et de monomères de dérivés acryliques ou méthacrylique, peut être utilisé dans l'isolement de matériel biologique, grâce à sa capacité à changer de structure en fonction de la
30 température. Il présente une structure déployée à basse température, qui facilite la fixation d'un matériel biologique, et une structure rétractée à haute température, qui permet la libération du matériel biologique fixé. Le contrôle des étapes de fixation et de
35 libération du matériel biologique peut donc être effectué

par variation de la température. Pour un meilleur contrôle, on peut en outre faire varier le pH.

L'utilisation proposée par ce document s'étend à l'isolement de tout matériel biologique présent dans un échantillon, et notamment matériel nucléique et matériel protéique, sans aucune spécificité.

Selon l'invention, on apporte un procédé d'isolement sélectif d'un matériel nucléique, présent dans un échantillon. Même si l'échantillon est complexe et contient un matériel protéique et/ou des inhibiteurs de réaction enzymatique, le procédé de l'invention limite voire supprime tout isolement du matériel protéique et/ou desdits inhibiteurs, tout en favorisant l'isolement du matériel nucléique.

Un procédé d'isolement en phase aqueuse, selon l'invention, d'un matériel nucléique présent dans un échantillon, comprend les étapes suivantes :

selon une étape (a) dite d'obtention du réactif d'adsorption, on dispose d'un réactif d'adsorption comprenant un sol constitué par une phase continue aqueuse et une phase discontinue du support particulaire qui comprend un polymère particulaire, fonctionnalisé, ledit polymère étant obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3) au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et hydrosoluble, ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui est comprise entre 25 et 45°C, de préférence entre 30 et 40°C,

selon une étape (b) dite de mise en contact, on met en contact le réactif d'adsorption avec l'échantillon contenant le matériel nucléique,

selon une étape (c) dite d'adsorption, pour la mise en contact selon (b), on choisit au moins un et de préférence au moins deux des paramètres suivants pour le milieu réactionnel:

- pH au plus égal à 7,

- force ionique au plus égale à 10^{-2} M,
 - température inférieure à la LCST du polymère,
- selon une étape (d) dite de séparation, après

éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu,
5 on sépare, de la phase continue, la phase discontinue et
notamment celle ayant adsorbé le matériel nucléique,

selon une étape (e) dite de désorption, on
dissocie, par désorption, le matériel nucléique par
rapport au support particulaire, en augmentant la force
10 ionique jusqu'à une force ionique supérieure à 10^{-2} M.

Avantageusement, pour l'étape (e) de désorption,
on fait en outre varier au moins un des paramètres choisis
parmi le pH et la température comme suit :

- augmentation du pH jusqu'à un pH supérieur à 7,
- 15 - augmentation de la température jusqu'à une
température supérieure à la LCST du polymère.

L'invention concerne aussi un procédé d'isolement,
en phase aqueuse, d'un matériel nucléique, présent dans un
échantillon, comprenant une étape d'adsorption dudit
20 matériel nucléique, sur un support particulaire,
permettant une utilisation en l'état du matériel nucléique
adsorbé sur le support particulaire, dans une étape
ultérieure d'analyse. Ce procédé comprend les étapes
suivantes :

25 selon une étape (a) dite d'obtention du réactif
d'adsorption, on dispose d'un réactif d'adsorption
comprenant un sol constitué par une phase continue aqueuse
et une phase discontinue du support particulaire qui
comprend un polymère particulaire, fonctionnalisé, ledit
30 polymère étant obtenu par polymérisation de (1) un premier
monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé
d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3)
au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et
hydrosoluble, et ledit polymère présentant une température
35 critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui
est comprise entre 25 et 45°C,

selon une étape (b) dite de mise en contact, on met en contact le réactif d'adsorption avec l'échantillon contenant le matériel nucléique,

5 selon une étape (c) dite d'adsorption, on choisit, pour la mise en contact selon (b), une force ionique au plus égale à 10^{-2} M pour le milieu réactionnel,

selon une étape (d) dite de séparation, après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, on sépare la phase discontinue de la phase continue,
10 procédé selon lequel l'étape de désorption est facultative.

Conformément à une mise en oeuvre préférentielle ce dernier procédé, selon l'étape (c) d'adsorption, on choisit en outre, pour la mise en contact selon (b), au
15 moins un des paramètres suivants pour le milieu réactionnel :

- pH au plus égal à 7,
- température inférieure à la LCST du polymère.

Bien entendu, ce procédé peut comprendre, après
20 l'étape (d) de séparation, une étape dite de désorption, selon laquelle on dissocie, par désorption, le matériel nucléique par rapport au support particulaire, en faisant varier au moins un des paramètres choisis parmi la force ionique, le pH et la température, comme suit :

- 25
- augmentation de la force ionique jusqu'à une force ionique supérieure à 10^{-2} M,
 - augmentation du pH jusqu'à un pH supérieur à 7,
 - augmentation de la température jusqu'à une température supérieure à la LCST du polymère.

30 On fait avantageusement varier au moins la force ionique.

Les procédés définis ci-dessus selon l'invention seront préférentiellement mis en oeuvre selon deux variantes relatives à l'étape (a).

35 Selon une première variante qui sera illustrée dans les Exemples, le support particulaire consiste en

ledit polymère particulaire, et dans ce cas le ou les agents de réticulation (2) sont hydrosolubles.

Selon une seconde variante, le support particulaire comprend en outre un noyau organique ou inorganique, recouvert en totalité ou en partie par ledit polymère particulaire, ledit noyau ne modifiant pas les propriétés d'adsorption du polymère vis-à-vis dudit matériel nucléique. Le noyau ou partie du noyau remplit alors la fonction de l'agent de réticulation (2), un autre agent de réticulation du type agent de réticulation hydrosoluble pouvant être prévu. A titre d'exemple, le noyau peut être un noyau de polystyrène, et/ou comprendre un composé magnétique.

Selon une mise en oeuvre particulière et préférentielle de ces procédés, on ajoute dans l'échantillon avant l'étape (b), ou dans le milieu réactionnel après l'étape (b), et notamment après l'étape (c) ou l'étape (d), au moins une sonde et/ou une amorce susceptible de s'hybrider spécifiquement sur le matériel nucléique avant ou après l'étape (b).

Dans une autre mise en oeuvre particulière, le matériel nucléique consiste en une sonde ou une amorce, et selon (b) et (c) on met en contact le réactif d'adsorption avec ledit matériel nucléique, pour obtenir un réactif d'hybridation, puis selon (b') après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, et séparé du milieu réactionnel le réactif d'hybridation, on met en contact ledit réactif d'hybridation avec un milieu contenant au moins un acide nucléique ou fragment d'acide nucléique, dans des conditions adaptées pour l'hybridation ou l'élongation de l'amorce.

Le polymère particulaire est avantageusement obtenu par polymérisation radicalaire, en présence d'un amorceur de polymérisation, cationique ou neutre, et hydrosoluble.

Le premier monomère (1) est de préférence choisi parmi les N-alkylacrylamides et les N,N-dialkylacrylamides, et plus particulièrement parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM).

Le ou les seconds monomères, fonctionnels (3) sont de préférence choisis parmi les dérivés acryliques et méthacryliques, le chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM), les dérivés de N-vinyl-pyridine, les dérivés de trialkylammonium et les dérivés de chlorure d'isothiouronium.

Avantageusement l'agent de réticulation hydrosoluble (2) est choisi parmi le N,N-méthylène bisacrylamide (MBA), l'éthylène glycol diméthacrylate, et l'amorceur de polymérisation est le chlorure de 2,2'-azobis amidino-propane (V50).

L'étape (d) de séparation est de préférence effectuée selon une technique choisie parmi la centrifugation, la filtration, la précipitation, la sédimentation et l'application d'un champ magnétique.

Avant l'étape (d) de séparation on peut éventuellement observer que la réaction d'adsorption s'est produite. A titre d'exemple, on peut utiliser les techniques de HPLC ou d'électrophorèse capillaire.

Avant d'exposer plus en détail l'invention, certains termes employés dans la présente description et dans les revendications sont ci-après définis :

Par isolement d'un matériel nucléaire selon l'invention, on comprend la séparation, la détection de ce matériel, l'enrichissement d'une fraction en matériel nucléaire, selon une méthode d'isolement spécifique ou aspécifique, de manière qualitative et/ou quantitative.

Un matériel nucléique selon l'invention est un acide nucléique, un fragment d'acide nucléique, un mélange d'acides nucléiques et/ou de fragments d'acides nucléiques, ou une fraction d'acides nucléiques et/ou de fragments d'acides nucléiques. Par acide nucléique, on entend tout acide nucléique, sous forme libre ou combinée éventuellement à des protéines, quelle que soit son origine cellulaire, bactérienne, virale ou autre. Il s'agit indifféremment d'un acide désoxyribonucléique ou d'un acide ribonucléique, constitué par un enchaînement de nucléotides naturels dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine, et/ou de nucléotides modifiés dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées, telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine, et telles que des bases modifiées par un traceur détectable directement ou indirectement par des techniques connues de l'homme du métier, à titre d'exemple les bases modifiées par la biotine ; au niveau du sucre, à savoir le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide ; et/ou au niveau du groupement phosphate par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl- et aryl-phosphonate et d'alkyl- et aryle-phosphorothioate. L'acide nucléique selon l'invention est totalement ou partiellement monocaténaire et/ou bicaténaire, en particulier il peut consister en un duplex sonde-acide nucléique, sonde-fragment d'acide nucléique, amorce-acide nucléique ou amorce-fragment d'acide nucléique ; le duplex peut être un homoduplex ou un hétéroduplex.

L'invention est bien sûr appliquée à l'isolement de fragments d'acides nucléiques tels que définis ci-dessus, ou oligonucléotides (ODN), de tailles variables.

Le matériel nucléique peut être d'origine naturelle, et/ou obtenu par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique, à titre d'exemple il peut consister en une sonde ou une amorce.

La présente invention est appliquée à l'isolement aspécifique d'une fraction d'acides nucléiques et/ou de fragments d'acides nucléiques, contenue dans un échantillon, mais aussi à l'isolement spécifique d'un acide nucléique ou d'un fragment d'acide nucléique, ou d'un mélange d'acides nucléiques ou de fragments d'acides nucléiques, présents dans un échantillon.

Un échantillon tel qu'on l'entend selon l'invention, comprend tout échantillon susceptible de contenir un matériel nucléique, notamment un échantillon biologique tel que celui obtenu à partir d'un fluide biologique, un échantillon d'origine alimentaire. L'échantillon consiste en tout ou partie d'un échantillon, en particulier il peut consister en un aliquote, une dilution. L'échantillon peut ou non avoir été soumis à un traitement préalable notamment de purification ou de lyse afin de faciliter la libération des acides nucléiques.

La LCST d'un polymère tel que celui qui fait l'objet de la présente invention est notamment définie et mesurée par des techniques décrites dans les documents suivants : Hiroshi Inomata et al., Macromolecules 1994, 27, 6459-6464.

Une sonde est un fragment nucléotidique possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un fragment nucléotidique. Une sonde utilisée dans le cadre de la présente invention sera de préférence une sonde de capture, sans pour autant exclure de ce cadre les autres types de sondes.

Par amorce selon l'invention, on entend une sonde possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), la technique dite NASBA ("Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) ou encore la technique dite TMA (Transcription Mediated Amplification), dans un procédé d'élongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue.

Par dérivé acrylamide selon l'invention, on entend un monomère polymérisable répondant à la formule $R^0-CH=C(R^1)-CONR^2R^3$, dans laquelle R^0 , R^1 , R^2 et R^3 représentent un groupe indépendamment choisi parmi l'hydrogène, les groupes hydrocarbonés inférieurs, linéaires ou ramifiés, aliphatiques ou cycliques, les groupes hétérocycliques azotés tels que l'imidazole.

L'adsorption de matériel nucléique telle qu'entendue selon la présente invention est définie comme suit : un matériel nucléique est adsorbé sur un support particulaire si après un temps de contact entre ledit matériel et ledit support, au moins un des groupes appartenant aux éléments constitutifs du matériel nucléique est fixé à la surface du support ; l'adsorption résulte d'interactions ioniques et/ou de liaisons hydrogène, et éventuellement d'interactions hydrophobes, à l'exclusion de toute liaison covalente, entre le matériel et le support.

Enfin par polymère fonctionnalisé, on entend un polymère présentant au moins une interface portant des groupes fonctionnels susceptibles de générer avec des groupes des éléments constitutifs du matériel nucléique, l'une quelconque des interactions et/ou liaisons impliquées dans le phénomène d'adsorption. De préférence ces groupes fonctionnels sont choisis parmi NH_3^+ ; NH_4^+ ; NR_3^+ où R représente un groupe hydrocarboné, saturé ou

insaturé, aliphatique ou cyclique, NR_3^+ pouvant représenter le groupe pyridinium ; et le groupe isothiouronium.

La présente invention est à présent décrite en
5 référence aux Exemples 1 à 6 et aux Figures 1 à 7 présentées ci-après :

Figure 1 représente la variation de l'interface du polymère en fonction du pH et de la température,

Figure 2 représente l'effet du pH et de la
10 température sur l'adsorption de l'ARN,

Figure 3 représente l'effet du pH à 40°C sur l'adsorption de la BSA,

Figure 4 représente l'effet de la force ionique et de la température sur l'adsorption de l'ARN,

15 Figure 5 représente l'effet du pH à 20°C sur la désorption de l'ARN,

Figure 6 représente l'effet du pH à 40°C sur la désorption de l'ARN, et

20 Figure 7 représente l'effet de la force ionique à pH 9,2 et à 20°C sur la désorption de l'ARN.

Pour les figures 2 à 4, la valeur N_s correspond à la quantité de l'entité biologique fixée sur le polymère et est exprimée en milligrammes de molécules biologiques fixées par milligramme de polymère.

25 Pour les figures 5 à 7, la valeur N_s correspond au pourcentage d'ARN libérés (N_s libre) ou d'ARN non libérés (N_s résiduel), par rapport à la quantité d'ARN préalablement adsorbée sur les particules conformément à l'exemple 2.

30 Comme les exemples suivants l'illustreront, les conditions de pH, de force ionique et/ou de température au cours de l'étape (c) d'adsorption sont déterminantes. En effet, comme on peut l'observer sur la Figure 1, en-dessous d'une valeur de pH égale à 7 et de température
35 inférieure à la LCST du polymère, le polymère présente une chevelure hydrophile, chargée, alors qu'au-dessus d'une

valeur de pH égale à 7 et de température supérieure à la LCST le polymère présente une conformation rétractée hydrophobe et neutre, ce qui entraîne une diminution de l'adsorption des acides nucléiques et à la fois une
5 adsorption croissante des protéines.

EXEMPLE 1 : PRÉPARATION D'UN POLYMÈRE À BASE DE NIPAM

Trois techniques de polymérisation ont été
10 utilisées pour la préparation de ce polymère :
1) polymérisation en batch (ou procédé en réacteur fermé);
2) polymérisation en semi-continu et 3) polymérisation sur semence. Dans chacune de ces techniques, les mêmes réactifs suivants ont été utilisés :

15 * Premier monomère : N-isopropylacrylamide (NIPAM) commercialisé par Kodak,

* Réticulant : N,N-méthylène bisacrylamide (MBA) disponible chez Aldrich,

20 * Amorceur : chlorure de 2,2'-azobis amidino propane (V50) commercialisé par Wako,

* Sel pour ajuster la force ionique : NaCl (Prolabo),

* Second monomère, fonctionnel : chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM) commercialisé par Kodak.

25

1) Polymérisation en batch

Le premier monomère (NIPAM), le second monomère, fonctionnel (AEM) et le réticulant (MBA) sont introduits ensemble en une seule étape avant que la polymérisation ne
30 soit amorcée par addition de l'amorceur (V50) qui se décompose sous l'effet de la chaleur en produisant des radicaux libres. La durée de polymérisation est de 30 min.

La formulation du polymère obtenu à qui on a affecté la référence PNIPAM42 est la suivante :

35	volume total(a)	250 ml
	NIPAM	48,51 mmoles

MBA	3 mmoles
AEM	0,48 mmoles
V50	0,30 mmoles
Température	70°C

5 (a) eau bouillie et dégazée

Les caractéristiques du polymère obtenu sont reportées dans le tableau I suivant:

Tableau I

diamètre ^(a) DDL 20°C	diamètre ^(b) taille DDL 40°C	diamètre ^(c) MET	concentration en AEM ^(d)	LCST ^(e)	CCC ^(f) à 20°C
292 nm	164 nm	129 nm	14,1 µmol/g de polymère	31,5 °C	1.00 mole/l

10

15

(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C

(b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C

20 (c) diamètre mesuré par microscopie électronique à transmission

(d) densité de charge exprimée en µmole (amine primaire)/g de polymère

25 (e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée par mesure de turbidité en fonction de la température

(f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C déterminée par mesure de turbidité en fonction de la salinité (NaCl).

30

2) Polymérisation en semi-continu

Une partie de second monomère, fonctionnel est introduite dans le réacteur sur une période comprise entre le début de la polymérisation et la fin de la conversion totale de celle-ci. Cet ajout peut être effectué à une vitesse d'injection constante (polymérisation par ajout continu) ou bien suivant un ajout bien contrôlé à des

intervalles réguliers (polymérisation en semi-continu). Le but de cette méthode de polymérisation est d'augmenter l'incorporation de second monomère, fonctionnel (chargé) sans augmenter le pourcentage de polymère hydrosoluble dans le milieu réactionnel qui pourrait perturber le déroulement de la polymérisation.

La formulation du polymère obtenu à qui on a affecté la référence PNIPAM45 est la suivante :

	volume total(a)	250 ml
10	NIPAM	48,51 mmoles
	MBA	3 mmoles
	AEM	0,48 mmoles
	V50	0,30 mmoles
	Température	70°C
15	ajouts	entre 3 et 6 min

(a) eau bouillie et dégazée

Les caractéristique du polymère PNIPAM45 obtenu sont reportées dans le tableau II suivant :

20

Tableau II

25

diamètre ^(a) DDL 20°C	diamètre ^(b) taille DDL 40°C	diamètre ^(c) MET	concentration en AEM ^(d)	LCST ^(e)	CCC ^(f) à 20°C
823 nm	530 nm	327 nm	10,0 µmol/g de polymère	32 °C	1.00 mole/l

(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C

(b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C

(c) diamètre mesuré par microscopie électronique à transmission

(d) densité de charge exprimée en µmole (amine primaire)/g de polymère

- (e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée par mesure de turbidité en fonction de la température
- (f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C déterminée par mesure de turbidité en fonction de la salinité (NaCl).

3) Polymérisation sur semence

Cette technique consiste à introduire le second monomère, fonctionnel dans un milieu réactionnel contenant un polymère préalablement préparé et parfaitement caractérisé. Le second monomère, fonctionnel peut être additionné seul ou en mélange avec le ou les monomère(s) ou les comonomères, en une étape ou en semi-continu.

La formulation du polymère obtenu à qui on a affecté la référence PNIPAM94 est la suivante :

Un volume de 40 ml de semence à un taux de solide de 4,5 % est utilisé. Les réactifs ont été ajoutés dilués dans un volume de 5 ml d'eau. Les pourcentage molaires de NIPAM, de MBA et de V50 ajoutés dans la deuxième étape sont identiques à ceux de la semence (cf 1)). En revanche, la concentration en second monomère, fonctionnel est contrôlée (augmentée ou diminuée suivant la densité de charge voulue) ; dans ce cas 10 % (mole) de AEM sont ajoutés par rapport au premier monomère NIPAM.

Les caractéristiques du polymère PNIPAM94, obtenu après réensemencement à partir de la semence inscrite sous la référence PNIPAM93 synthétisée suivant le mode opératoire décrit dans 1), sont reportées dans le tableau III suivant :

Tableau III

diamètre ^(a) DDL 20°C	diamètre ^(b) taille DDL 40°C	diamètre ^(c) MET	concentration en AEM ^(d)	LCST ^(e)	CCC ^(f) à 20°C
504 nm	290 nm	176 nm	22,4 µmol/g de polymère	32 °C	1.10 mole/l

- (a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C
- 5 (b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C
- (c) diamètre mesuré par microscopie électronique à transmission
- (d) densité de charge exprimée en $\mu\text{mole}(\text{amine primaire})/\text{g}$
10 de polymère
- (e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée par mesure de turbidité en fonction de la température
- (f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C
15 déterminée par mesure de turbidité en fonction de la salinité (NaCl).

En fin de polymérisation les particules sont collectées par simple centrifugation et redispersées dans l'eau ou dans un milieu désiré.

- 20 Les caractéristiques du polymère obtenu selon l'une quelconque des techniques 1) à 3) sont les suivantes :

- densité de charge (cationique) entre 5 et 150 $\mu\text{mol/g}$ de polymère
- 25 - intervalle de la taille des particules comprise entre 0,05 et 2 μm , diamètre des particules mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C
- intervalle de la concentration critique de coagulation (CCC) entre 0,001 et 1,5 mole/l NaCl à 20°C et
30 entre 0,01 et 0,9 mole/l NaCl à 40°C.

EXEMPLE 2: ADSORPTION D'ARN OU DE BSA (SERUMALBUMINE BOVINE) SUR DES PARTICULES DE POLYMÈRE PNIPAM TELLES QUE PRÉPARÉES SELON L'EXEMPLE 1

- 35 Le protocole suivant constitue le mode opératoire général des réactions d'adsorption:

Le mélange réactionnel est constitué de 10 μ l d'ARN (4 mg/ml) ou de 50 μ l de BSA (5 mg/ml), et de 50 μ l de particules NIPAM (45g/l). Le volume final de un millilitre est obtenu par adjonction de tampon phosphate (10 mM pH 4,6 ou 9,2) et NaCl (5M) afin d'atteindre le pH et la force ionique désirée.

L'entité moléculaire (ARN ou BSA) est adsorbée sur les particules durant 2 heures (à 20 ou 40°C) avec des conditions prédéterminées (pH, force ionique): le mélange est centrifugé 20 minutes à 14 000 tours par minute. Le surnageant est récupéré, filtré sur filtre Millipore Millex-GV13 (0,22 μ m) afin d'éliminer les particules de polymère en suspension. La quantité de l'entité biologique fixée sur le support polymère est déterminée par une simple différence entre la quantité initialement introduite et la quantité restante et libre (dosée dans le surnageant): cette quantité est exprimée en milligramme de molécules biologiques par milligramme de polymère (Ns). Les concentrations d'ARN ou de BSA sont estimées par spectrophotométrie UV (Kontron Instrument) à une longueur d'onde de 260 nm ou 280 nm, respectivement.

Les essais ont été réalisés avec de l'ARN 16S et 23S ribosomal de *E. coli* (Boerhinger) et de la BSA (Sigma référence A0281) utilisés sans purification préalable.

Les particules utilisées sont des particules thermosensibles de PNIPAM94. Ces particules sont très hydrophiles à température ambiante et hydrophobes à une température supérieure à la LCST (32°C). Elles ont été synthétisées comme décrit dans l'exemple 1.

Des tampons phosphate acide (KH_2PO_4 10 mM pH 4,6) et basique (K_2HPO_4 10 mM pH 9,2) ont été utilisés pour les réactions d'adsorption et pour contrôler le pH des réactions.

NaCl (5M) a été utilisé pour contrôler la force ionique des réactions.

L'eau utilisée dans l'ensemble des réactions a été purifiée sur le système de purification Millipore-Milli Q.

Les incubations ont été réalisées sur un thermomixer (Eppendorf 5436).

5 Toutes les réactions ont été réalisées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml.

1) Etude de l'influence du pH et de la température sur l'adsorption

10 Conformément à la Figure 2, on observe une meilleure adsorption de l'ARN à pH acide qu'à pH basique. A pH acide les particules sont largement chargées positivement et les acides nucléiques chargés négativement se fixent sur les particules via des forces
15 électrostatiques. La fixation est plus importante à 20°C qu'à 40°C. Les résultats à 40°C illustrent une diminution de l'adsorption.

Conformément à la Figure 3, à 40 °C l'adsorption de la BSA sur les particules est possible sans influence
20 du pH. A 20°C on n'observe aucune fixation de BSA en raison du caractère hydrophile des particules à cette température.

25 2) Etude de l'influence de la force ionique et de la température sur l'adsorption

Conformément à la Figure 4, les forces électrostatiques attractives entre les ARN chargés négativement et la surface de polymère chargée positivement diminuent avec l'augmentation de la force
30 ionique avec comme conséquence une diminution de la fixation de l'ARN.

Dans les mêmes conditions expérimentales, il a été vérifié que l'augmentation de la force ionique ne favorise pas la fixation de la BSA sur les particules.

35 En conclusion, les acides nucléiques sont préférentiellement adsorbés sur les particules à

température inférieure à la LCST (20°C), à faible force ionique et pH acide. Dans ces conditions l'adsorption des protéines (telle la BSA) n'est pas favorisée.

5 **EXEMPLE 3: DÉSORPTION D'ARN ADSORBÉ SUR DES PARTICULES DE POLYMÈRE PNIPAM**

Les réactifs utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans l'exemple 2.

10 Le protocole suivant constitue le mode opératoire général des réactions de désorption:

Après une étape d'adsorption réalisée comme dans l'exemple 2, la réaction de désorption est effectuée après l'étape de centrifugation à 14000 tours par minute. le surnageant est éliminé et remplacé par un millilitre de
15 tampon de désorption (phosphate (10mM pH 4,6 ou 9,2) et NaCl (5M)) afin d'atteindre le pH et la force ionique désirée. La désorption est réalisée pendant 2 heures à 20°C ou 40°C. Le mélange est ensuite centrifugé 20 minutes à 14000 tours par minute. Le surnageant est récupéré,
20 filtré sur filtre Millipore Millex-GV13 (0,22 µm) afin d'éliminer les particules de polymère en suspension. La quantité d'ARN libérée est déterminée par spectrophotométrie UV (Kontron Instrument) à une longueur d'onde de 260 nm. L'acide nucléique récupéré est
25 disponible pour d'autres analyses.

1) Etude de l'influence du pH et de la température sur la désorption de l'ARN

Conformément à la Figure 5, la désorption des
30 acides nucléiques à pH basique est plus importante en raison de la perte de charge sur le polymère; à pH acide la quantité d'acides nucléiques libérés est beaucoup plus faible car les particules sont alors fortement chargées positivement.

35 Conformément à la Figure 6, comme précédemment la désorption des acides nucléiques est favorisée à pH

basique. Elle est également favorisée par l'augmentation de la température car pour une température supérieure à la LCST (32°C) les particules se rétractent.

5 2) Etude de l'influence de la force ionique sur la désorption de l'ARN

Conformément à la Figure 7, au fur et à mesure de l'augmentation de la force ionique, les interactions électrostatiques attractives entre les ARN et la surface
10 du polymère diminuent.

En conclusion, la désorption des acides nucléiques est préférentiellement réalisée à 40°C, à forte force ionique et pH basique.

Par ailleurs, la propriété de rétraction des
15 particules à 40°C (température supérieure à la LCST) peut être exploitée pour concentrer une solution d'acide nucléique. En effet, après adsorption des acides nucléiques et élévation de la température au-delà de la LCST, les particules sur lesquelles sont adsorbés les
20 acides nucléiques se rétractent, occupant ainsi un volume moindre qu'à l'état relaxé et permettant la reprise des particules, après centrifugation, dans un volume final plus faible.

25 **EXEMPLE 4: ADSORPTION ET DÉSORPTION D'ADN À PARTIR D'UNE SOLUTION MIXTE D'ADN ET DE BSA, EN UTILISANT LES PARTICULES DE NIPAM**

La solution d'ADN de *Staphylococcus epidermidis* est extraite et purifiée à partir de colonies isolées de
30 bactéries, selon le protocole décrit par D. TRECO dans Short Protocols in Molecular Biology Second Edition Ed : Harvard Medical School, 1992, pp 2-4/2-7.

Une solution de BSA (serum bovine albumine) (Intergen 3210-01) 10 % (p/v) en eau milliQ est utilisée.

35 Protocole PCR: la technique de PCR suivie est celle décrite par Goodman dans PCR Strategies Ed : Innis,

Gelfand et Sninsky Academic Press 1995, pp17-31. Deux amorces d'amplification ont été utilisées; elles présentent les séquences suivantes:

Amorce 1 : 5' ATCTTGACATCCTCTGACC 3'--->SEQ ID N01

5 Amorce 2 : 5' TCGACGGCTAGCTCCAAAT 3'--->SEQ ID N02

Les cycles de température suivants ont été utilisés lors du protocole d'amplification:

1 fois	3 minutes	94°C
10	2 minutes	65°C
35 fois	1 minute	72°C
	1 minute	94°C
	2 minutes	65°C
1 fois	5 minutes	72°C

15 10 µl de produit d'amplification sont déposés sur gel d'agarose 0,8% (FMC 50003) préalablement coloré au bromure d'éthidium. Après migration électrophorétique 45 minutes à 180V, les bandes d'acides nucléiques sont visualisées sous rayonnement ultra-violet (D. VOYTAS dans
20 Short Protocols in Molecular Biology Second Edition Ed : Harvard Medical School, 1992, pp2-13/2-14).

25 1) Adsorption et désorption d'ADN sur les particules et détection après technique PCR, de l'ADN libéré

Une solution d'ADN (10^{10} copies/ml) a été adsorbée sur les particules à 20°C, pH 4,6 pendant deux heures puis soumise à une étape de désorption de 15 minutes à 41°C, pH 8,3, force ionique 0,05 M comme décrit dans les exemples 2
30 et 3, respectivement. Après l'étape de désorption et centrifugation, le matériel récupéré dans 50 µl de surnageant a été amplifié par PCR et analysé sur gel d'agarose 0,8 %. Une bande de taille attendue (490 pb) est détectée sur gel. Par ailleurs, la quantité d'ADN détectée
35 après PCR est au moins équivalente à celle détectée après

amplification par PCR de 10^6 copies/ml d'ADN non adsorbé au préalable sur particules.

Les particules de NIPAM94 peuvent donc être également utilisées pour adsorber de l'ADN. Après
5 désorption l'ADN peut être utilisé dans une réaction d'amplification de type PCR.

2) Adsorption d'ADN à partir d'une solution mixte ADN et BSA, et détection après technique PCR, de l'ADN
10 libéré par désorption

Une solution d'ADN (10^{10} copies/ml) en présence de 10 % (p/v) de BSA est soumise à une étape d'adsorption et de désorption comme décrit dans l'exemple 4-1. Les mêmes techniques d'amplification et de détection sont utilisées.
15 Un ADN de taille attendue (490 pb) est détecté sur gel. L'intensité de la bande d'ADN visualisée est la même en présence ou en absence de BSA.

Les particules de NIPAM94 permettent d'adsorber et de libérer par désorption de l'ADN provenant d'une
20 solution mixte ADN - 10% BSA. La présence de la BSA dans la solution initiale ne perturbe pas l'adsorption de l'ADN sur les particules.

EXEMPLE 5 : PURIFICATION D'ACIDES NUCLEIQUES ISSUS
25 D'UN LYSAT BACTERIEN (*Staphylococcus epidermidis*) EN UTILISANT LES PARTICULES DE NIPAM

1) Préparation du lysat bactérien

Une culture de *Staphylococcus epidermidis* est réalisée pendant une nuit à 37°C. Le nombre de bactéries
30 contenues dans la suspension est estimé par mesure de la densité optique à 550 nm. Des culots bactériens, contenant respectivement $2 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^4$ et $2 \cdot 10^1$ bactéries, sont réalisés en tubes de 1,5 ml par centrifugation 3 minutes à 14 000 tours. Le surnageant est éliminé et le culot
35 bactérien est lysé selon la technique décrite ci-dessous

(adaptation de Arora et al., J. Dairy Sci. 1990, 73, 264-273).

Le culot est repris par 1 ml de tampon (Tris 30 mM, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7,2) contenant 6 mg/ml de protéinase K (Boehringer) et 300 µl de billes de verre. Ce mélange est agité sur un vortex et incubé 15 minutes à 37°C. Après une étape de centrifugation (3 minutes à 14 000 tours), le surnageant, contenant les acides nucléiques est récupéré pour les étapes ultérieures.

2) Purification des acides nucléiques

Les particules utilisées sont des particules thermosensibles de PNIPAM94 dont la synthèse est décrite dans l'exemple 1.

Le protocole suivant constitue le mode opératoire général des réactions de purification.

Le mélange réactionnel est constitué de 50 µl de lysat bactérien, contenant respectivement 10^5 , 10^3 et 10^6 bactéries, et de 2 mg de particules. Le volume final de un millilitre est obtenu en complétant le volume réactionnel par du tampon phosphate (10 mM, pH 4,6). La réaction est incubée durant 30 minutes sur un thermomixer (Eppendorf 5436) à 20°C. Après une étape de centrifugation de 20 minutes, à 14 000 tours par minute, le surnageant est éliminé. La désorption des acides nucléiques, fixés sur les particules, est réalisée par l'effet de la force ionique en ajoutant 50 µl de tampon d'élution (KCl 0,5 M, pH 8,3) ; la réaction est incubée durant 15 minutes à 42°C sur le thermomixer. Après une nouvelle étape de centrifugation de 20 minutes, à 14 000 tours par minute, le surnageant contenant les acides nucléiques est récupéré ; 10 µl sont utilisés pour une étape d'amplification de l'ADN (PCR) et 5 µl pour une étape d'amplification de l'ARN (NASBA).

3) Détection des acides nucléiques

Les acides nucléiques purifiés sont analysés après une étape d'amplification enzymatique (PCR pour ADN et NASBA pour ARN). Les produits d'amplification sont ensuite révélés par des techniques ELOSA (Enzyme Linked Oligo Sorbent Assay) en microplaque (NASBA) ou VIDAS (PCR).

Protocole PCR : le protocole suivi est le même que celui décrit dans l'exemple 4. Les produits d'amplification (90 µl) sont analysés sur l'automate d'immuno-analyse Vidas (bioMérieux) conformément au protocole décrit par Mabilat et al., J. Clin. Microbiol ; 1994, 32, 2702-2705, les sondes de capture et de détection étant les suivantes :

sonde de capture :

5' ACCACCTGTCACTCTGTCCC 3' SEQ ID NO: 3

sonde de détection :

5' GGAAGGGGAAACTCTATCTC 3' SEQ ID NO: 4

La sonde de détection est conjuguée à la phosphatase alcaline.

Protocole NASBA : le protocole suivi est le même que celui décrit par Kievits et al., J. Virol. Methods (1991) 35, 273-286. Les amorces utilisées présentent les séquences suivantes :

amorce 1 :

5' TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA 3' SEQ ID NO: 5

amorce 2 :

5' AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGGTT TGTCACCGGC AGTCAACTTA GA 3' SEQ ID NO: 6

Les produits d'amplification (5 µl) sont analysés avec une technique Elosa en format microplaque conformément au protocole décrit par Mallet et al., J. Clin. Microbiol. (1993) 31, 1444-1449. Les sondes de capture et de détection présentent les séquences suivantes :

sonde de capture :

5' GATAGAGTTTTCCCCTTC 3' SEQ ID NO: 7

sonde de détection :

5' GACATCCTCTGACCCCTCTA 3' SEQ ID NO: 8

La sonde de détection est conjuguée à la peroxydase de raifort.

5 La protéinase K étant un inhibiteur connu des réactions d'amplification, des dilutions de 1/10 en 1/10, sont réalisées avant les étapes d'amplification pour quantifier le degré de purification obtenu.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le
10 tableau IV en annexe.

On vérifie le pouvoir inhibiteur de la protéinase K puisqu'il faut diluer l'échantillon au 1/1 000 avant l'étape d'amplification. Après l'étape de purification l'échantillon n'est plus dilué qu'au 1/10 avant l'étape
15 d'amplification, ce qui représente un gain d'un facteur 100. Les particules permettent de purifier conjointement l'ARN et l'ADN présents dans l'échantillon. Ces acides nucléiques sont compatibles avec les étapes d'amplification enzymatique.

20

EXEMPLE 6 : PURIFICATION D'ACIDES NUCLEIQUES ISSUS D'UN LYSAT BACTERIEN (*Staphylococcus epidermidis*) EN UTILISANT LE POLYMER NIPAM GREFFE SUR UN NOYAU MAGNETIQUE

Les particules décrites dans les exemples
25 précédents présentent l'inconvénient de nécessiter des étapes de centrifugation après les étapes d'adsorption et de désorption. Ces étapes sont longues (2 fois 20 minutes) et difficilement automatisables. Une alternative possible est de greffer le polymère de Nipam sur des supports
30 magnétiques cationiques. Un des supports testés est le latex magnétique cationique R95-07 (Estapor, Rhône-Poulenc) dont les particules sont polydisperses.

La capacité de purification des particules ainsi obtenues a été testée.

35

1) Synthèse des particules magnétiques de Nipam

Les particules Estapor cationiques R95-07 ont été encapsulées. Avant chaque encapsulation les particules ont été lavées 3 fois avec une solution d'acide chlorhydrique 0,005 M.

5 1 g de particules semence est dilué dans 40 ml d'eau milliQ préalablement chauffée à ébullition et dégazée avec de l'azote.

Styrène : 100 µg

NIPAM : 0,3254 g

10 BAM : 0,0274 g

MAE : 0,0740 g

Triton X-405 : 0,14 g

V50 : 0,0061 g

15 100 µg du styrène pour l'étape de prégonflement (temps 2 h à 70°C), le NIPAM, BAM et MAE sont solubilisés dans 10 ml d'eau et introduits sur la semence (latex Estapor). L'amorceur solubilisé dans 1 ml d'eau, est ajouté pour permettre la polymérisation autour des particules semence. La polymérisation a été réalisée sous
20 atmosphère d'azote, à 70°C.

Ces particules portent alors une charge de 220 et de 82 µmol de NH₂/g de particules sans modifier le distribution en taille des particules.

25 2) Purification des acides nucléiques

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 5 avec les modifications suivantes.

- 200 µg de particules ont été utilisées,
- les étapes de centrifugation, pour séparer les
30 particules des surnageants, sont supprimées et remplacées par des étapes de séparation sous l'effet d'un champ magnétique (dispositif de séparation magnétique, Promega Z5342).

L'ensemble des autres étapes demeure inchangé.

35 Les résultats sont rassemblés dans le tableau V en annexe.

On retrouve le pouvoir inhibiteur de la protéinase K puisqu'il faut diluer l'échantillon au 1/1 000 avant l'étape d'amplification. Après l'étape de purification, l'échantillon peut être dilué au 1/10 (PCR) ou 1/100 (NASBA) avant l'étape de purification, ce qui représente un gain d'un facteur 10 à 100. Ces particules permettent également de purifier conjointement l'ARN et l'ADN présent dans l'échantillon. Ces acides nucléiques sont compatibles avec les étapes d'amplification enzymatique.

TABLEAU IV

		Avant Purification	Après Purification
PCR VIDAS	10exp7 bactéries.	neg°	nt*
	1/10	neg	+++
	1/100	neg	+++
	1/1000	+++	+++
	1/10000	+++	nt
	10exp5 bactéries.	neg	nt
	1/10	neg	+++
	1/100	neg	+
	1/1000	+	neg
	1/10000	neg	nt
	10exp0 bactéries.	neg	nt
	1/10	neg	neg
	1/100	neg	neg
	1/1000	neg	+
	1/10000	neg	nt
NASBA ELOSA	10exp7 bactéries	neg	nt
	1/10	neg	+++
	1/100	neg	+++
	1/1000	+++	+++
	1/10000	+++	nt
	10exp5 bactéries.	neg	nt
	1/10	neg	neg
	1/100	neg	+++
	1/1000	++	+++
	1/10000	+++	nt
	10exp0 bactéries.	neg	nt
	1/10	neg	+
	1/100	neg	+++
	1/1000	+++	+++
	1/10000	+++	nt

VIDAS

> 5000 RFV§: +++

2000-5000 RFV: ++

500-2000 RFV: +

< 500 RFV: neg

ELOSA

DO# saturée: +++

DO 1000-2500: ++

DO 300-1000: +

DO < 300: neg

°neg: négatif

*nt: non testé

§RFV: relative fluorescent value

#DO: densité optique

TABLEAU V

		Avant Purification	Après Purification	
PCR VIDAS	10exp7 bactéries.	neg°	nt*	
	1/10	neg	+++	
	1/100	neg	++	
	1/1000	+++	+	
	1/10000	+++	nt	
	10exp5 bactéries.	neg	nt	
	1/10	neg	neg	
	1/100	neg	neg	
	1/1000	+	neg	
	1/10000	neg	nt	
	10exp0 bactéries.	neg	nt	
	1/10	neg	neg	
	1/100	neg	++?	
	1/1000	neg	neg	
	1/10000	neg	nt	
MASBA ELOSA	10exp7 bactéries.	neg	nt	
	1/10	neg	neg	
	1/100	neg	+++	
	1/1000	+++	+++	
	1/10000	+++	nt	
	10exp5 bactéries.	neg	nt	
	1/10	neg	neg	
	1/100	neg	+	
	1/1000	++	+++	
	1/10000	+++	nt	
	10exp0 bactéries.	neg	nt	
	1/10	neg	neg	
	1/100	neg	+++	
	1/1000	+++	+++	
	1/10000	+++	nt	

VIDAS

> 5000 RFV§: +++

2000-5000 RFV: ++

500-2000 RFV: +

< 500 RFV: neg

ELOSA

DO# saturée: +++

DO 1000-2500: ++

DO 300-1000: +

DO < 300: neg

°neg: négatif

*nt: non testé

§RFV: relative fluorescent value

#DO: densité optique

REVENDICATIONS

1. Procédé d'isolement, en phase aqueuse, d'un matériel nucléique, présent dans un échantillon, 5 comprenant une étape d'adsorption dudit matériel nucléique, sur un support particulaire, caractérisé en ce que :

* selon une étape (a) dite d'obtention du réactif d'adsorption, on dispose d'un réactif d'adsorption 10 comprenant un sol constitué par une phase continue aqueuse et une phase discontinue du support particulaire qui comprend un polymère particulaire, fonctionnalisé, ledit polymère étant obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé 15 d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3) au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et hydrosoluble, et ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui est comprise entre 25 et 45°C,

20 * selon une étape (b) dite de mise en contact, on met en contact le réactif d'adsorption avec l'échantillon contenant le matériel nucléique,

* selon une étape (c) dite d'adsorption, pour la mise en contact selon (b), on choisit au moins un des 25 paramètres suivants pour le milieu réactionnel:

- pH au plus égal à 7,
- force ionique au plus égale à 10^{-2} M,
- température inférieure à la LCST du polymère,

* selon une étape (d) dite de séparation, après 30 éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, on sépare la phase discontinue de la phase continue, et

* selon une étape (e) dite de désorption, on dissocie, par désorption, le matériel nucléique par rapport au support particulaire, en augmentant la force 35 ionique jusqu'à une force ionique supérieure à 10^{-2} M.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que pour l'étape (e) de désorption, on fait en outre varier au moins un des paramètres choisis parmi le pH et la température comme suit :

- 5 - augmentation du pH jusqu'à un pH supérieur à 7,
- augmentation de la température jusqu'à une température supérieure à la LCST du polymère.

3. Procédé d'isolement, en phase aqueuse, d'un matériel nucléique, présent dans un échantillon, 10 comprenant une étape d'adsorption dudit matériel nucléique, sur un support particulaire, caractérisé en ce que :

* selon une étape (a) dite d'obtention du réactif d'adsorption, on dispose d'un réactif d'adsorption 15 comprenant un sol constitué par une phase continue aqueuse et une phase discontinue du support particulaire qui comprend un polymère particulaire, fonctionnalisé, ledit polymère étant obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé 20 d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3) au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et hydrosoluble, et ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui est comprise entre 25 et 45°C,

25 * selon une étape (b) dite de mise en contact, on met en contact le réactif d'adsorption avec l'échantillon contenant le matériel nucléique,

* selon une étape (c) dite d'adsorption, on choisit, pour la mise en contact selon (b), une force 30 ionique au plus égale à 10^{-2} M pour le milieu réactionnel,

* selon une étape (d) dite de séparation, après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, on sépare la phase discontinue de la phase continue.

4. Procédé selon la revendication 3, 35 caractérisé en ce que, selon l'étape (c) d'adsorption, on choisit en outre, pour la mise en contact selon (b), au

moins un des paramètres suivants pour le milieu réactionnel :

- pH au plus égal à 7,
- température inférieure à la LCST du polymère.

5 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le support particulaire consiste en un polymère particulaire, fonctionnalisé, obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé
10 d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation hydrosoluble et (3) au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et hydrosoluble, et ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui est comprise entre 25
15 et 45°C.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le support particulaire comprend en outre un noyau organique ou inorganique, recouvert en totalité ou en partie par ledit
20 polymère particulaire, ledit noyau ne modifiant pas les propriétés d'adsorption du polymère vis-à-vis dudit matériel nucléique.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le noyau est un noyau de
25 polystyrène.

8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que le noyau comprend un composé magnétique.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on ajoute
30 dans l'échantillon avant l'étape (b), ou dans le milieu réactionnel après l'étape (b) et notamment après l'étape (c) ou l'étape (d), au moins une sonde et/ou une amorce susceptible de s'hybrider spécifiquement sur le matériel
35 nucléique.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que :

* selon (b) et (c), on met en contact le réactif d'adsorption avec le matériel nucléaire consistant en une sonde ou une amorce, pour obtenir un réactif d'hybridation,

* selon (b'), après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, et séparé du milieu réactionnel le réactif d'hybridation, on met en contact ledit réactif d'hybridation avec un milieu contenant au moins un acide nucléique ou fragment d'acide nucléique, dans des conditions adaptées pour l'hybridation ou l'élongation de l'amorce.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la LCST du polymère est comprise entre 30 et 40°C.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le premier monomère (1) est choisi parmi les N-alkylacrylamides et les N,N-dialkylacrylamides.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le premier monomère (1) est choisi parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM).

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le ou les seconds monomères fonctionnels (3) sont choisis parmi les dérivés acryliques et méthacryliques, le chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM), les dérivés de N-vinylpyridine, les dérivés de trialkylammonium et les dérivés de chlorure d'isothiouronium.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent de réticulation hydrosoluble (2) est choisi parmi le N,N-méthylène bisacrylamide (MBA), l'éthylène glycol diméthacrylate.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'amorceur de polymérisation est choisi parmi les amorceurs neutres et cationiques, hydrosolubles, tel que le chlorure de 2,2'-azobis amidino-propane (V50).

17. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comprend, après l'étape (d) de séparation, une étape dite de désorption, selon laquelle on dissocie, par désorption, le matériel nucléaire par rapport au support particulaire, en faisant varier au moins un des paramètres choisis parmi la force ionique, le pH et la température, comme suit :

- augmentation de la force ionique jusqu'à une force ionique supérieure à $10^{-2}M$,
- augmentation du pH jusqu'à un pH supérieur à 7,
- augmentation de la température jusqu'à une température supérieure à la LCST du polymère.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape (d) de séparation est effectuée par une technique choisie parmi la centrifugation, la filtration, la précipitation, la sédimentation, et l'application d'un champ magnétique.

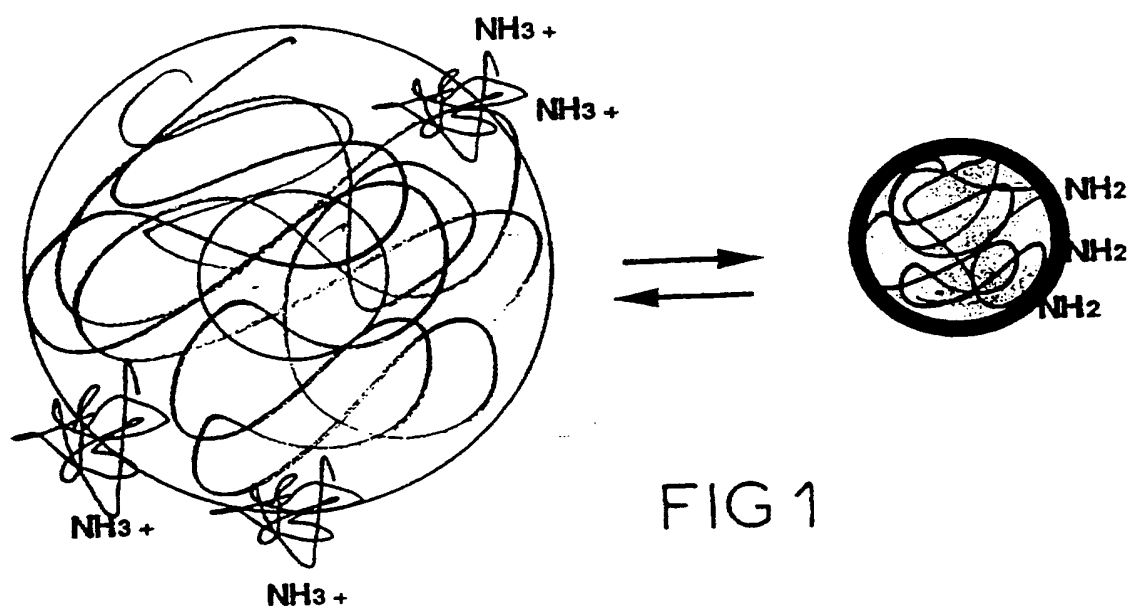


FIG 2

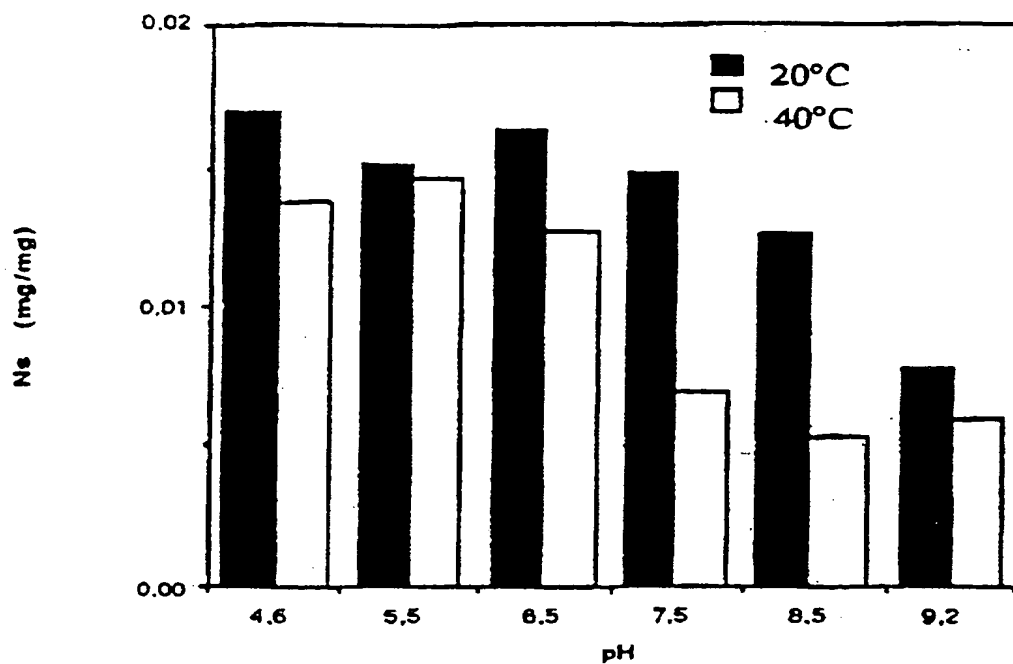


FIG 3

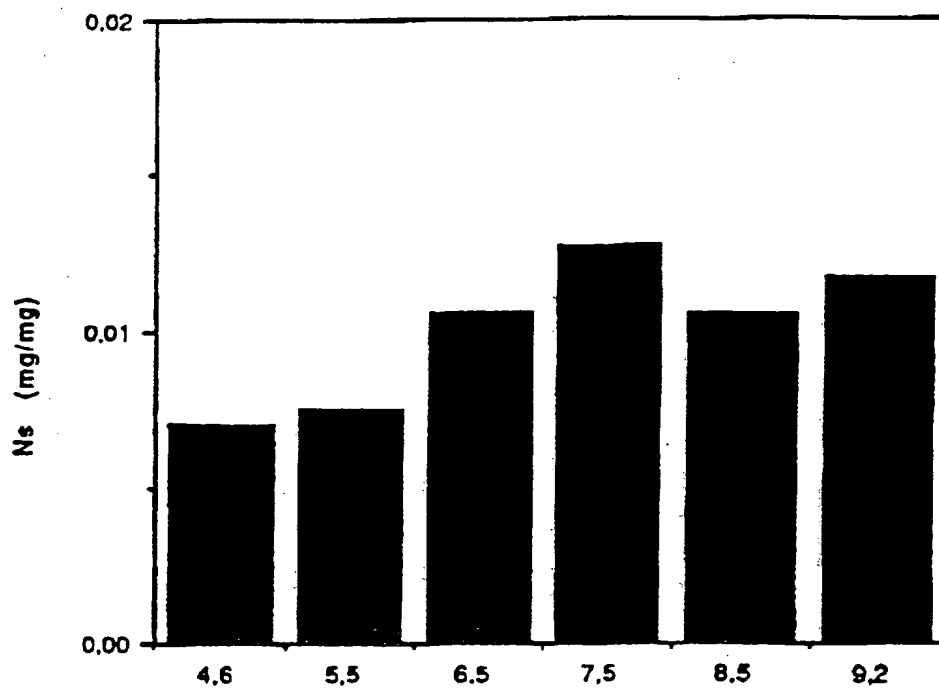


FIG 4

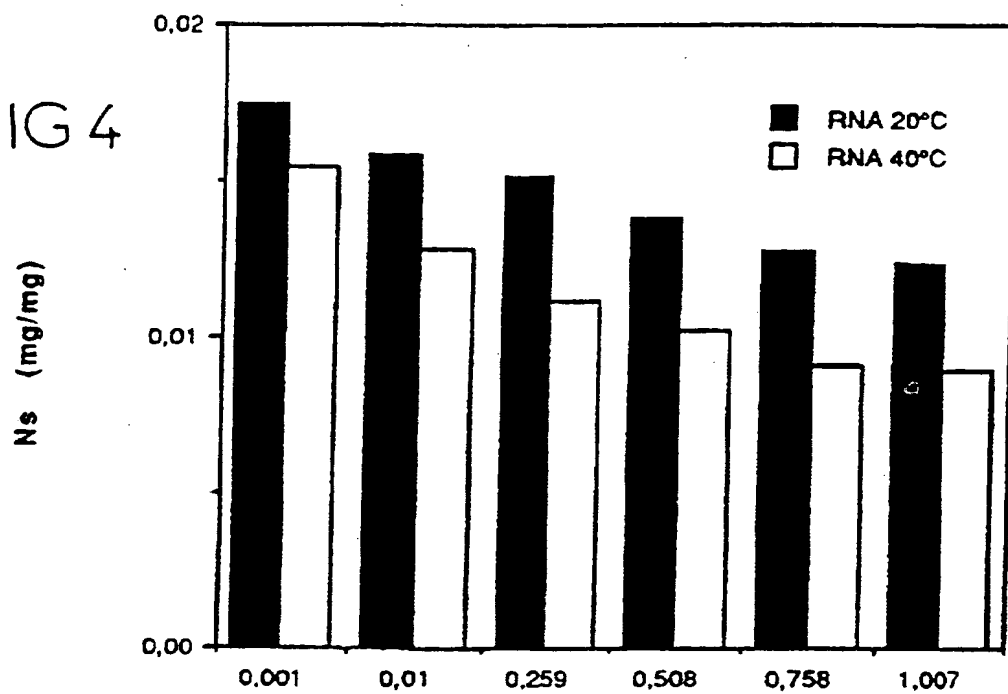


FIG 5

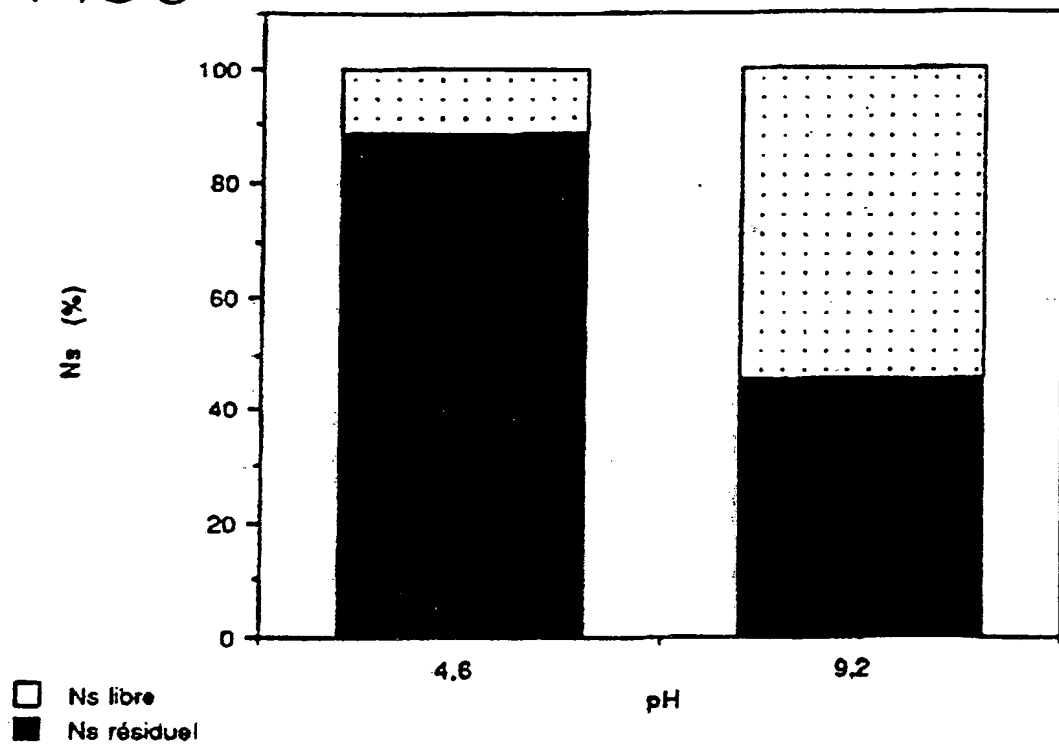


FIG 6

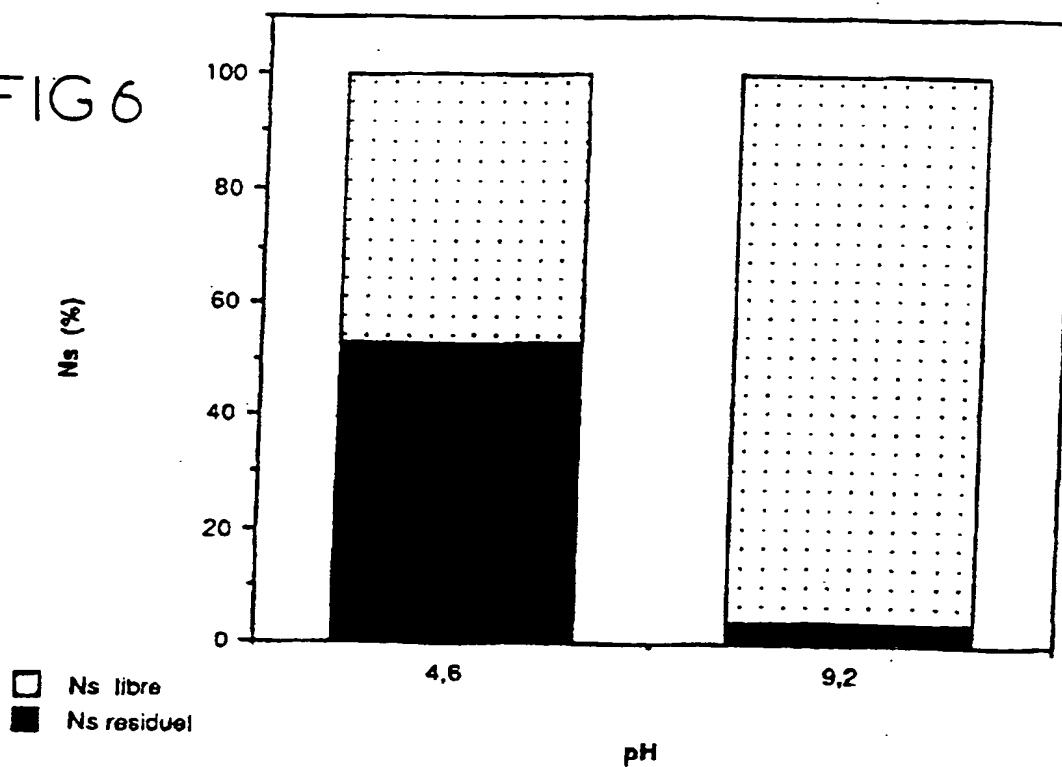
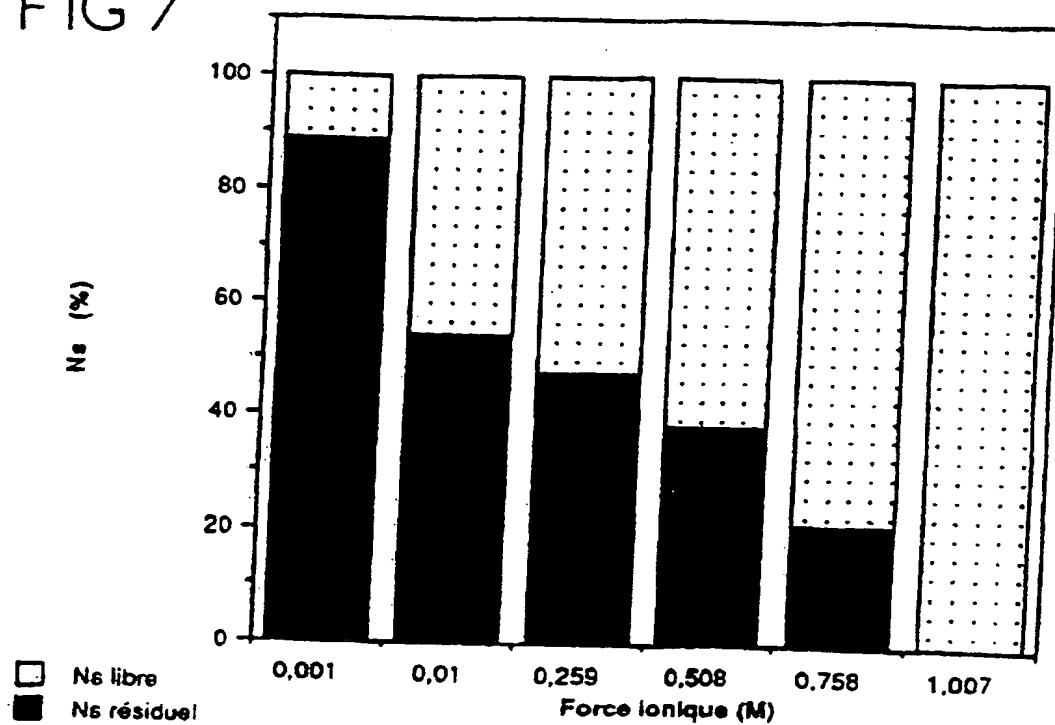


FIG 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/00496

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07H1/08 C12Q1/68 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07H C12Q G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 161 881 A (MITSUI TOATSU CHEMICALS) 21 November 1985 cited in the application see page 4, line 17 - page 8, line 6 see page 10, line 21 - page 11, line 25 see page 15, line 2 - line 25 see page 44, line 13 - page 45, line 5 see page 47, line 19 - line 24 see page 48, line 25 - page 49, line 9	1
A		2-5, 12-15,17
A	EP 0 501 301 A (W.R. GRACE & CO) 2 September 1992 see the whole document	5-7, 11-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- * 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

* 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

* 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 July 1997

Date of mailing of the international search report

21-07-1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Classification No.
PCT/FR 97/00496

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 37 17 209 A (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK) 1 December 1988	1
A	see the whole document	2-7
A	--- POLYMERS FOR ADVANCED TECHNOLOGIES, vol. 6, no. 7, 1995, CHICHESTER GB, pages 489-496, XP000518430 F. MEUNIER ET AL.: "Preparation and characterization of cationic poly(N-isopropylacrylamide) copolymer latexes" cited in the application see the whole document	1-5, 11-14
A	--- US 4 997 932 A (M.A. ET AL. REARDON) 5 March 1991 see column 2, line 25 - column 3, line 14	1
A	--- EP 0 366 241 A (FISHER SCIENTIFIC COMPANY) 2 May 1990 see column 14, line 11-20 * abstract *	1-10
A	--- US 4 767 700 A (R.B. WALLACE) 30 August 1988 see the whole document -----	1-5, 9, 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No
PCT/FR 97/00496

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0161881 A	21-11-85	JP 8009684 B	31-01-96
		JP 60233109 A	19-11-85
		JP 1859989 C	27-07-94
		JP 60250016 A	10-12-85
		CA 1279307 A	22-01-91
		DE 3584467 A	28-11-91
		US 4729834 A	08-03-88
EP 0501301 A	02-09-92	JP 4278451 A	05-10-92
		JP 4278452 A	05-10-92
		US 5238545 A	24-08-93
		US 5225062 A	06-07-93
DE 3717209 A	01-12-88	NONE	
US 4997932 A	05-03-91	AT 151433 T	15-04-97
		DE 69030449 D	15-05-97
		EP 0508985 A	21-10-92
		EP 0747387 A	11-12-96
		EP 0747388 A	11-12-96
		WO 9107422 A	30-05-91
EP 0366241 A	02-05-90	JP 2210242 A	21-08-90
US 4767700 A	30-08-88	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den XXXXXXXXXX Internationale No
PCT/FR 97/00496

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07H1/08 C12Q1/68 G01N27/447

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07H C12Q G01N C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 161 881 A (MITSUI TOATSU CHEMICALS) 21 Novembre 1985 cité dans la demande voir page 4, ligne 17 - page 8, ligne 6 voir page 10, ligne 21 - page 11, ligne 25 voir page 15, ligne 2 - ligne 25 voir page 44, ligne 13 - page 45, ligne 5 voir page 47, ligne 19 - ligne 24 voir page 48, ligne 25 - page 49, ligne 9	1
A	---	2-5, 12-15,17
A	EP 0 501 301 A (W.R. GRACE & CO) 2 Septembre 1992 voir le document en entier ---	5-7, 11-17
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- * A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- * E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- * L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- * O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- * P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- * T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- * X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- * Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- * &* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 Juillet 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21-07-1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (- 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No
PCT/FR 97/00496

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cites, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DE 37 17 209 A (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK) 1 Décembre 1988	1
A	voir le document en entier	2-7
A	--- POLYMERS FOR ADVANCED TECHNOLOGIES, vol. 6, no. 7, 1995, CHICHESTER GB, pages 489-496, XP000518430 F. MEUNIER ET AL.: "Preparation and characterization of cationic poly(N-isopropylacrylamide) copolymer latexes" cité dans la demande voir le document en entier	1-5, 11-14
A	--- US 4 997 932 A (M.A. ET AL. REARDON) 5 Mars 1991 voir colonne 2, ligne 25 - colonne 3, ligne 14	1
A	--- EP 0 366 241 A (FISHER SCIENTIFIC COMPANY) 2 Mai 1990 voir colonne 14, ligne 11-20 * abrégé *	1-10
A	--- US 4 767 700 A (R.B. WALLACE) 30 Août 1988 voir le document en entier -----	1-5,9,10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres des familles de brevets

De [redacted] internationale No

PCT/FR 97/00496

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0161881 A	21-11-85	JP 8009684 B	31-01-96
		JP 60233109 A	19-11-85
		JP 1859989 C	27-07-94
		JP 60250016 A	10-12-85
		CA 1279307 A	22-01-91
		DE 3584467 A	28-11-91
		US 4729834 A	08-03-88

EP 0501301 A	02-09-92	JP 4278451 A	05-10-92
		JP 4278452 A	05-10-92
		US 5238545 A	24-08-93
		US 5225062 A	06-07-93

DE 3717209 A	01-12-88	AUCUN	

US 4997932 A	05-03-91	AT 151433 T	15-04-97
		DE 69030449 D	15-05-97
		EP 0508985 A	21-10-92
		EP 0747387 A	11-12-96
		EP 0747388 A	11-12-96
		WO 9107422 A	30-05-91

EP 0366241 A	02-05-90	JP 2210242 A	21-08-90

US 4767700 A	30-08-88	AUCUN	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)